

XP-002211867

AN - 1992-188063 [30]

A - [001] 014 028 04- 074 076 086 147 198 231 240 250 31- 336 501 525 575
583 589 62- 645 688 720 724 023 061 127 158 200 201 202 251 258 267 276

AP - JP19900239387 19900910; [Previous Publ. JP4121187] ; JP19900239387
19900910

CPY - NIHA

DC - A96 B04 D16

FS - CPI

IC - A61K37/54 ; A61K38/46 ; A61P35/00 ; C12N9/78 ; C12N15/09 ; C12N15/55

KS - 0013 0231 0619 1279 1588 2002 2014 2022 2512 2585 2675 2766

MC - A10-E01 A12-V01 B04-B02C3 B04-C03C B12-G07 D05-A01A2 D05-A01B3

M1 - [01] F012 F014 F016 F580 H5 H522 H589 H8 M210 M211 M272 M282 M312 M323
M332 M342 M383 M393 M423 M510 M521 M530 M540 M710 M903 M904 P633 V802
V814; 00212; 9223-17201-N

PA - (NIHA) NIPPON MINING CO

PN - JP3209338B2 B2 20010917 DW200161 C12N9/78 010pp
- JP4121187 A 19920422 DW199223 C12N9/78 006pp

PR - JP19900239387 19900910

XA - C1992-085826

XIC - A61K-037/54 ; A61K-038/46 ; A61P-035/00 ; C12N-009/78 ; C12N-015/09 ;
C12N-015/55 ; (C12N-009/78 C12R-001/01) ; (C12N-009/78 C12R-001/01)

AB - J04121187 Polyethylene glycol (PEG) modified arginine deaminase (I)
which is chemically modified with PEG or its deriv. is new. It is
prepd. by covalent bonding arginine deiminase and PEG or its deriv.
High blood stable anticancer drug which contains PEG modified arginine
deaminase as an active component.

- Pref. (I) is of formula (A) (where AD is arginine daiminase, n is opt.
numerical No. of av. mw. of PEG 1000-10000). Arginine deiminase has
physico-chemical properties of (a) it hydrolysates amidino gp. of
L-arginine to form L-citrulline and ammonia, (b) optimum pH 6.0-7.5,
(c) stable pH 4.5-9.0, (d) optimum temp. ca 50 deg.C, (e) km value ca
0.2 mM, (f) pi ca 4.7, (g) mw. ca 45000 (SDS-polyacrylamide gel E.P.),
ca 90000 (gel filtration HPLC).

- USE/ADVANTAGE - The cpd. has equal anticancer effect as that of
arginine deiminase, the blood stability is raised, antigenicity is
reduced, furthermore it is low toxic, it can be used for an anticancer
drug, advantageously.

- (e used)

C - C12N9/78 C12R1/01

- C12N9/78 C12R1/01

CN - 9223-17201-N

IW - POLYETHYLENE GLYCOL MODIFIED ARGININE DEAMINASE PREPARATION COVALENT
BOND ARGININE POLYETHYLENE GLYCOL USEFUL ANTICANCER DRUG

IKW - POLYETHYLENE GLYCOL MODIFIED ARGININE DEAMINASE PREPARATION COVALENT
BOND ARGININE POLYETHYLENE GLYCOL USEFUL ANTICANCER DRUG

NC - 001

OPD - 1990-09-10

ORD - 1992-04-22

PAW - (NIHA) NIPPON MINING CO

RRL - 00212

TI - Polyethylene glycol modified arginine deaminase prepn. - by covalently

bonding arginine deiminase and ethylene] glycol, useful as anticancer drug

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平4-121187

⑬ Int. Cl.⁵
C 12 N 9/78
A 61 K 37/54
// C 12 N 15/55
(C 12 N 9/78
C 12 R 1:01)

識別記号 ZNA
ADU

府内整理番号 7823-4B
8317-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)4月22日

8717-4B C 12 N 15/00

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全6頁)

⑮ 発明の名称 ポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼおよびその製造法

⑯ 特 願 平2-239387

⑰ 出 願 平2(1990)9月10日

⑱ 発 明 者 高 久 春 雄 埼玉県戸田市新曾南3丁目17番35号 日本鉱業株式会社内

⑲ 出 願 人 日本鉱業株式会社 東京都港区虎ノ門2丁目10番1号

⑳ 代 理 人 弁理士 藤野 清也

明細書

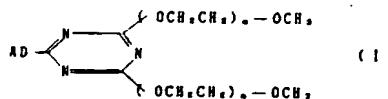
1. 発明の名称

ポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼおよびその製造法

2. 特許請求の範囲

(1) ポリエチレングリコールまたはその誘導体により化学修飾されたポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(2) 式 (1)



で表される請求項(1)記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(式中、A Dはアルギニンデイミナーゼを表し、nはポリエチレングリコールの平均分子量が1,000 ~ 10,000となる任意の正の整数を表す)

(3) アルギニンデイミナーゼが次の理化学的性質

を有する請求項(1)または(2)に記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ
(イ) L-アルギニンのアミジノ基を加水分解してレシトルリンとアンモニアを生成する

(ロ) 至適pH: 6.0 ~ 7.5

(ハ) 安定pH: 4.5 ~ 9.0

(ニ) 至適温度: 約50℃

(ホ) イソ電: 約0.2mM

(ヘ) 等電点(pI): 約4.7

(ト) 分子量: 約45,000
(SDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動法による)
: 約90,000

(ゲル通過HPLC法による)

(4) アルギニンデイミナーゼがマイコプラズマ・アルギニイニ(*Mycoplasma arginini*)由来のものである請求項(1)~(3)のいずれかに記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(5) アルギニンデイミナーゼが第1回のアミノ酸

特開平4-121187(2)

配列を含有するものである請求項(1)～(4)のいずれかに記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンディミナーゼ

(6) アルギニンディミナーゼとポリエチレングリコールまたはその誤導体とを反応させて両者を共有結合させることを特徴とするポリエチレングリコール修飾アルギニンディミナーゼの製造法

(7) ポリエチレングリコール誤導体として2,4-ビス(2-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロローストリアジンを用いることを特徴とする請求項(5)に記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンディミナーゼの製造法

(8) 請求項(1)～(4)のいずれかに記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンディミナーゼを有効成分とする血中安定性の高い制癌剤

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規かつ有用なポリエチレングリコ

ール修飾アルギニンディミナーゼ、およびその製造法に関する。さらに本発明はこのポリエチレングリコール修飾アルギニンディミナーゼを有効成分とする血中安定性の高い制癌剤に関する。

(従来の技術)

近年、遺伝子工学の進歩やタンパク質を大量精製する技術の向上により、酵素や生理活性物質などを医療として使用する事が可能となった。癌治療の分野においても、癌細胞の栄養要求性に基づいた酵素療法([Nature誌、229: 168(1971), Br. J. Cancer誌、19: 379 (1965)])が注目されている。アルギニンディミナーゼ(EC 3.5. 3.6)は、癌細胞の増殖に必須であるL-アルギニンをL-シトルリンとアンモニアに加水分解することにより、in vitroにおいて強い制癌作用を示すことが知られている([Cancer Res誌、in press])。しかしながら、アルギニンディミナーゼには、酵素療法における固有な性質としての循環血液中からの急速な消失(クリアランス)の問題と、異種

タンパク質としての抗原性の問題が予想されている。

(発明が解決しようとする課題)

本発明はアルギニンディミナーゼのこのような欠点を解決するためになされたものであって、アルギニン分解能を保持し、血中安定性を向上させたアルギニンディミナーゼの化学修飾体を製造し、これを制癌剤として利用しようとするものである。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、アルギニンディミナーゼの化学修飾に使用する至適な合成高分子の探索研究を行った。

その結果、ポリエチレングリコールで化学修飾したアルギニンディミナーゼが優れた性質を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

ポリエチレングリコールは、それ自体毒性が低く、免疫原性がなく、また、水溶液中で酵素の立体構造に影響を与えないで酵素活性を保持する修飾試薬である。とりわけ、平均分子量1,000,

～10,000の該修飾試薬は該酵素の安定化と免疫原性の抑制に優れた効果を発揮することがわかった。

また、該修飾体は次の方法によって調製される。アルギニンディミナーゼは、いかなる生物由来のものを使用してもよい。たとえば、マイコプラズマ、シェードモナス、ストレプトコッカス等の微生物を例に挙げることができる。特に好適な菌株は、勧告研究所から入手することができるマイコプラズマアルギニイニ(M.arginini) [IFO 14476, ATCC23838 またはNCTC10129]である。

本発明のアルギニンディミナーゼは上記マイコプラズマの胞体抽出液から、ゲル通過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のカラムクロマトグラフィーによってアルギニンディミナーゼを分離精製することができる。また、遺伝子工学的手法を用いて生産することもできる。

本発明に用いられる特に好ましいアルギニンディミナーゼの一つは次の理化学的性質を有する。

特開平4-121187(3)

(イ) 作用

L-アルギニンのアミジノ基を加水分解してL-シトルリンとアンモニアを生成する。

(ロ) 至適pH: 6.0 ~ 7.5

(ハ) 安定pH: 4.5 ~ 9.0

(ニ) 至適温度: 約50℃

(ホ) 酸強度: 約0.2
モル

(ヘ) 等電点(pI): 約4.7

(ト) 分子量: 約45,000
(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による)

: 約90,000
(ゲル通過 HPLC法による)

(チ) N末端からのアミノ酸配列

Ser-Val-Phe-Asp-Ser-Lys-Phe-Lys-Gly.
Ile-His-Val-Tyr-Ser-Glu-

さらに、このアルギニンディミナーゼは第1図に示すアミノ酸配列を含有する。

また、修飾に使用するポリエチレングリコール(PEG)は、蛋白質と共有結合しうるものであれば、

いかなるものを用いててもよい。例えば、末端にカルボキシル基を有するポリエチレングリコールとN-ヒドロキシスルフォニミドとをカルボジイミドを用いて脱水結合して得られる活性型PEGなどが挙げられる。特に好適なものは、塩化シアヌル(2,4,6-トリクロロ-s-トリアジン)に2つのポリエチレングリコール(平均分子量約5000)鎖を結合させた活性型PEG₂(2,4-ビス(オーメトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン)である。該活性型PEG₂は常法に従い、合成・精製される。

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニンディミナーゼは上記の活性型PEG₂のトリアジン環と、前記のアルギニンディミナーゼの分子裏面に存在するアミノ基とを結合させることにより得ることができる。

尚、該修飾体の創癌活性は未修飾アルギニンディミナーゼと同等である。

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニ

ンディミナーゼは、試験例に示すように、優れた血中安定性を有することから、創癌剤として有用である。

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニンディミナーゼは、通常の製剤用担体、胚形網あるいは粘液網等を用いて慣用の方法で製剤することができる。この網型としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤等として経口投与したり、あるいは静注、筋注、動注等の注射剤の形として投与したり、また坐剤の形にして投与したりすることができる。

投与量は、症状や投与対象者の年令、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定されるが、通常成人1日当たり10~500mgであり、これを1日1回または数回に分けて投与する。

該修飾体の毒性については、これをマウスに経口的あるいは尾静脈内に1g/kg投与しても死亡例がなく、また投与後解剖した所見によると各臓器には何等の異常が観察されず、きわめて安全で

あることが分かった。

また、抗原性試験の結果、モルモットにおいて抗体生産性は著しく抑制され、免疫原性を減少していることがわかった。

実施例

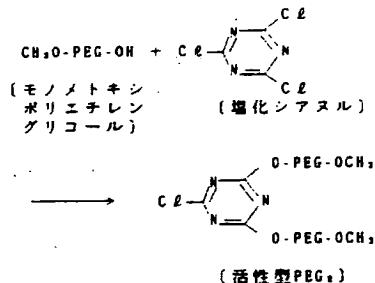
次に、本発明を実施例を示して具体的に説明する。

実施例1

ポリエチレングリコール(PEG)-修飾アルギニンディミナーゼの調製

(1) 2,4-ビス(オーメトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン(活性型PEG₂)の合成法

特開平4-121187 (4)



無水庚酸ナトリウム(10 g)とモレキュラー
シーヴ3A(5 g)を含む乾燥ベンゼン100 mL
にモノメトキシポリエチレングリコール(平均分
子量5000)(20 g)と塩化シアヌル(365 mg)
を添加し、80°Cで48時間還流した。次に反応
液に石油エーテル200 mLを添加し、生成した活
性型PEG_nを沈殿させた。この沈殿物を、ベンゼン/
アセトン(1:1)200 mLに溶解し、石油エ
ーテル200 mLで沈殿させる精製操作を3回繰り
返し、さらにゲル通過カラムクロマトグラフィー¹¹
により一本鎖の活性型PEG_nを除去したのち、凍結

乾燥して活性型PEG_n(10,3e)を得た。

(2) アルギニンディミナーゼの調製

マイコプラズマ・アルギニイニ(*M. arginini*)
 (IFO 14476株) を 30 L 培養液 (PPLO broth w/o
 CV (Difco) 21 g、L-アルギニン 10 g、馬血
 液 200 ml、2.5% 新鮮イーストエキス 100 ml、
 0.4% フェノールレッド液 5 ml 及び蒸留水 700 ml
 の組成よりなり、pH 7.0 に調整) に接種し、5%
 CO_2 インキュベーター内で 37°C において 2 日間
 静置培養した。次に得られた培養液を 7000 rpm で
 20 分間遠心することにより菌体 30 g を集菌し、
 これをリン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む生理食塩
 液 (PBS) で 2 回洗浄後、10 mM リン酸緩衝液 (pH
 7.0) 200 ml に懸濁した。この懸濁液を超音波
 处理してその中に含まれる菌体を破砕し、遠心分
 离によって不溶物を除き、得られた上清をマイコ
 プラズマ・アルギニイニ(*M. arginini*) の菌体抽
 出液とした。

上記で得られた固体抽出液を出発材料として、

通常用いられるカラムクロマトグラフィー（ゲル通過、陰イオン交換、アルギニン・アフィニティカラム）を行うことにより、アルギニンペプチダーゼ0.32gを得た。

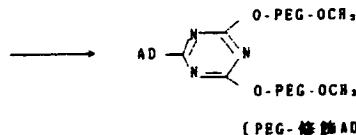
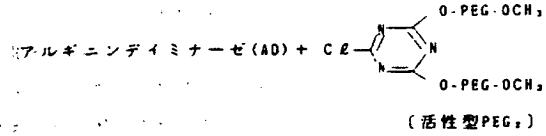
このときの結果を第1表に示す。

第一卷

精製工程	蛇蛋白 (g)	蛇活性 (U)	比活性 (U/g)	收率 (%)
粗体抽出液	1.36	1.63×10^4	12.0	(100)
Sephadryl S-300MR	0.61	1.60×10^4	26.2	98
DEAE- Toyopearl 650s	0.38	1.47×10^4	38.7	90
Argioline- Sepharose 4B	0.32	1.41×10^4	44.5	86

このアルギニンデミナーゼは、前記した理比學的性質を有し、第1図に示したアミノ酸配列を有していた。

(3) PEG修飾アルギニンディミナーゼの調製



(2)で調整したアルギニンディミナーゼ(2.5mg)に0.1M炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0)5mLを添加し、37℃で30分間攪拌した。氷冷した1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)5mLを添加し、反応を停止させた後、MX-50(アミコン社、分子量5万カット)を用いた限外濃過により未反応の活性化PEG₂を除去した。得られたPEG修飾アルギニンディミナーゼについて、リン酸緩衝液(pH 7.4)を含む生理食塩水(PBS)に対して透析した後、収量、比活性およびアミノ基の修飾率を測定した。

特開平4-121187(5)

定した。

なお、蛋白定量は牛血清アルブミンを標準として通常のピュレット法により、酵素活性は生成したシトルリンをArchibald の方法(J.Biol.Chem. 誌, 156, 121 (1944)により測定した。このとき、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のシトルリンを生成するアルギニンデミナーゼ活性を 1 単位(U) とし、比活性は酵素 1 mg当たりの単位数 (U/mg蛋白) で表わした。

また、PEG-修飾アルギニンデミナーゼのアミノ基修飾率は未修飾アルギニンデミナーゼを对照として2,4,6-トリエトロベンゼンスルホン酸(TNBS) を用いたSatakeらの方法(J.Biochem. 誌, 47, 654 (1960))により測定した。

このときの結果を第2表に示す。

項目	數値
収量	16.0 (mg蛋白)
比活性	25.5 (U/mg蛋白)
アミノ基修飾率	51 (%)

中アミノ酸濃度の測定は、各アミノ酸をケイ光試薬(NBD-F4, フルオロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール)を用いて試験体化したのち、高速液体クロマトグラフィーにより行った。このときの結果を第3表に示す。

実施例2

注射用酵素製剤の調製

実施例1-(3)で得られたPEG 修飾アルギニンデミナーゼをPBS を用いて希釈し、滅菌滅菌して25 U/mgの注射用酵素製剤を調製した。

なお、実施例1-(2)で得られた未修飾アルギニンデミナーゼを実施例2と同様にして注射用酵素製剤を調製し、比較試験の対照として使用した。

試験例

マウスにおける血中安定性の向上

7週齢の雄性CDFマウス6匹を無作為に对照群3匹、試験群3匹に群分けした。そして、実施例2で調製した未修飾アルギニンデミナーゼ製剤を对照群に、それぞれ0.2 ml (50 U/マウス) ずつ尾静脈内に投与し、投与1日後、3日後、8日後および15日後に尾静脈より採血を行った。

各製剤の血中安定性は、血中アルギニン濃度とシトルリン濃度の経時変化を指標した。なお、血

時 間	未修飾アルギニンデミナーゼ(对照群)		PEG-修飾アルギニンデミナーゼ(試験群)	
	アルギニン (μM)	シトルリン (μM)	アルギニン (μM)	シトルリン (μM)
投与前	177.0	68.4	242.0	77.6
投与後	0	0	0	0
1日	253.1	0	291.0	0
3日	289.6	0	1245.9	0
8日	117.3	65.7	0	340.6
15日	91.3	135.5	36.8	109.9

特開平4-121187(6)

この結果、試験群では対照群にくらべて血中のアルギニン濃度が長期間に亘り低減し、シトルリン濃度が増加しているので、PEG-修飾アルギニンデイミナーゼは血中で長期間安定にその作用を持续すると判断される。

(発明の効果)

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼは、アルギニンデイミナーゼと同等の制癌活性を示し、しかも血中安定性が向上し、抗原性が減少し、しかも低毒性であるので調剤剤として有用に利用することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明に好適に用いられるアルギニンデイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列及びその塩基配列を示す。

出願人 日本鉱業株式会社
代理人 駒野清也
代理人 宮田広豊

第1図-1

TCT CTA TTT CTC ACT AAA TTT AAA CGA ATT GCG CTT TAT TCA CGG ATT
Ser Val Phe Asp Ser Lys Pro Lys Gln Ile His Val Thr Ser Glu .16
1 5 10 15
CGT CGA TTA GAA TCA CCTT CTA CCTT CAC CGA CGA CGG CGA ATT CTC
Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile Asp
20 25 30
TAT ATT AGA CGG CCTT ACT AAC CTA CAT CAA TTA TTA TCA CCTT ATC TTT
Thr Ile Thr Pro Lys Arg Leu Asp Glu Leu Leu Val Ser Ala Ile Lys
35 40 45
GAA ACC AAC GAT CCT AGA AAA CGA CGG CGA CGG CGA CCT AAC TTA
Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Glu Phe Val Ala Glu Leu
50 55 60
ATA CGA AGC GAC ATC ATT CCTT CCTT CGA ATT CCTT CCTT CCTT CCTT
Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala Glu
65 70 75 80
AGA TAT GAT TTA CGA TCA CGA CGA CCT AAC GAC AAA TTA ATC TTT CGA
Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Glu Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu Glu
85 90 95
TTT TTA CGA CGC TCA CGA CGA CCTT CTA CGA CGA CGC AAA CCTT
Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val Val
100 105 110
CTA AGA AAC TGC TTA AAA CCTT AAA AGA TCA AGA CGA TTA CGA CGA
Val Arg Asp Phe Leu Lys Ile Lys Tyr Ser Ser Ile Glu Leu Val Glu
115 120 125
ATC ATC ATC CGA CGG ATC AGA AAC TAC GAT TTA CCTT ATC CGA CGA CCT
Ile Met Met Ala Glu Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Glu Ile Glu Ala Asp
130 135 140

第1図-2

CGA CGA TTA ATC GTT CTC CGA AGC CGA AAC CGT TCC AGA CCT CTC
Asp Glu Leu Ile Val Asp Ser Asp Phe Leu Lys Tyr Phe Thr Asp Asp
145 150 155 160
CGA TTT CGA TCA GAA CCTT AGT CCTT GCA AGA AAC TCC AAC TAC AAC CCTT TAC
Pro Phe Ala Ser Val Glu Asn Glu Val Ile His Tyr Asp Asp Thr
165 170 175
AGA CCTT AGA CGA CCTT CGA AGA AGA TTT TCA AGA CCTT GCA TCC TCA ATT
Lys Val Asp Glu Arg Glu Thr Leu Phe Ser Asp Phe Val Val Ser Asp
180 185 190
CAC CCTT AAA CGA ATT AAC ACT CGA TCA TAC TAC AAC CCTT CGA CCTT CGA
Glu Pro Leu Ile Asp Thr Pro Ile Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu Lys
195 200 205
TTA TCA ATC CGA CCTT CGG CGC CGA TTT ATC TAC AAC CCTT CGA AGA TTA
Leu Ser Ile Glu Glu Glu Arg Val Ile Ile Tyr Asp Asp Thr Leu
210 215 220
CTG CCTT CCTT TCT GAA AGA ACT GCG TTA CGA CGA CCTT CCTT CCTT
Val Val Glu Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Glu Thr Val Ile Leu Leu
225 230 235 240
CCT AAA AAC ATT CCTT CCTT CCTT AAC CGA CCTT CGA CCTT CCTT CCTT
Ala Lys Leu Ile Val Asp Leu Glu Glu Arg Glu Phe Lys Arg Ile Val
245 250 255
CGA ATT AAC CCTT CGA AAA TCA AGA AAC TTA CCTT CGA AAC TCA
Ala Ile Asp Val Pro Lys Thr Ile Leu Val His Leu Asp Val Thr
260 265 270
CTG AGA ATC TTG CGC AGG GAC AAA TGC CGA TAC TCA CGG AAC CCTT CCTT
Leu Thr Asp Ile Asp Lys Asp Lys Asp Thr Ser Pro Ile Ile Leu
275 280 285
CAC CCTT TTT AAA TTC TGA CAT TAT GAG TTA CGA AAC CCTT CGA CGA
Asp Val Phe Lys Phe Thr Asp Thr Ile Leu Val Ile Glu Glu Ala Glu
290 295 300

第1図-3

CGA CGA CGA CCTT GAA AAC CGG TTA CCTT CTA GAA CGA TTA TTA CGA TCA
Pro Glu Pro Val Glu Ile Glu Leu Pro Leu Glu Glu Leu Leu Glu Ser
305 310 315 320
ATC ATT AAC AAA AAA CGA CCTT TTA ATT CCTT ATC CGA CCTT CCTT
Ile Ile Asp Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Glu Glu Glu Ala
325 330 335
TCA CGA ATC CGA ATC CGA AGA Glu AGA Glu AGA CAC TTC GAT GGT AGA AAC TAC
Ser Glu Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Glu Thr Asp Tyr
340 345 350
TTA CGA ATT AGA CGA CCTT
Leu Ala Ile Arg Pro Glu Val Val Ile Glu Tyr Ser Arg Asp Glu Lys
355 360 365
AGA AAC CCTT
Thr Asp Ala Leu Glu Ile Ala Glu Ile Lys Val Leu Pro Phe His
370 375 380
GGT AAC CGA CCTT TCA TTA CCTT CCTT CCTT CCTT CCTT CCTT CCTT CCTT CCTT
Gly Ile Glu Leu Ser Leu Glu Met Glu Asp Ala Asp Glu Met Ser Ser
385 390 395 400
CCT TTA TCA CCTT AAA GAT CCTT AAC TGC TGA
Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Thr
405